



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 41 36 462 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 B 57/00**  
B 01 D 15/08  
B 01 D 57/02  
// C 08 B 37/16, C 07 F  
9/6574, C 07 C 33/22

②1 Aktenzeichen: P 41 36 462.7  
②2 Anmeldetag: 1. 11. 91  
④3 Offenlegungstag: 6. 5. 93

DE 41 36 462 A 1

⑦1 Anmelder:  
Schurig, Volker, Prof. Dr., 7400 Tübingen, DE

⑦2 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

⑤4 Verfahren zur Enantiomerentrennung an chiral modifizierten Trennoberflächen durch Elektromigration in Kapillarsäulen

⑤7 Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Trennung von Enantiomeren durch elektrokinetische Verfahren in Kapillarsäulen unter Verwendung von oberflächenfixierten chiralen Komponenten. Als chirale Komponente wird beispielsweise ein Polysiloxan, an das alkyliertes Cyclodextrin ( $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ ) chemisch gebunden wurde und welches an die im Trennsystem befindlichen Oberflächen immobilisiert wurde, verwendet. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur qualitativen und quantitativen Analyse von Isomeren, insbesondere von Enantiomeren, die mit herkömmlichen Methoden schlecht oder nur mit großem Aufwand getrennt werden. Insbesondere besteht keine Beschränkung auf unzersetzt flüchtige Analyte wie in der Gaschromatographie. Ein typischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist neben der hohen Auflösung die lange Lebensdauer der verwendeten Anordnung. Die bei Verwendung als Zusatz zur mobilen Phase übliche Notwendigkeit der de-novo-Bereitstellung der Trennkomponente nach jedem Analysengang erübrigt sich im erfindungsgemäßen Verfahren.

DE 41 36 462 A 1

## Beschreibung

Gegenüber chromatographischen Methoden weisen Elektromigrationsverfahren in Kapillaren (Kapillarzonenelektrophorese, Kapillarisotachophorese, Micellare elektrokinetische Chromatographie MEKC etc.) wichtige Vorteile auf wie höchste Effizienz, frontale Elutionsprofile, Miniaturisierung und einfache Apparaturen.

Novotny bezeichnete kürzlich die Technik der Kapillarelektrophorese (CE) als "the ultimate in bioanalytical separation" und wies auf deren Bedeutung für die Trennung optischer Isomere (Enantiomere) hin (vgl. LC-GC Intl., Vol. 4 (No. 9), S. 48 (1991)). Ein entscheidender Vorteil der Elektromigrationsverfahren besteht darin, daß die Auftrennung von Analyten nach dem elektrophoretischen Trennprinzip durch Verwendung von micellenbildenden oberflächenaktiven Substanzen oder inklusionsfähigen Agenzien (Cyclodextrine) aufgrund zusätzlicher chromatographischer Verteilungsgleichgewichte noch verbessert werden kann ("zweidimensionale Elektrochromatographie"). Enantiomerentrennungen in der Kapillarelektrophorese wurden bisher überwiegend durch Zusatz eines chiralen Selektors (z. B. Kupfer-L-Histidin-Komplexe, Cyclodextrine) zur mobilen Pufferlösung durchgeführt (E. Gassmann, J. Kuo, R.J. Zare, Science, 230 (1985) 813; H. Nishi, T. Fukujama, M. Matsuo, S. Terabe, J. Microcol. Sep., 1 (1989) 234; S. Terabe et al., J. Chromatogr. 332 (1985) 211 und 553 (1991) 503; J. Snopek, E. Smolkova-Keulemansova, J. Chromatogr. 438 (1988) 211; S. Fanali, ibid., 545 (1991) 437). Der Einbau von Cyclodextrinen in Gele in der Kapillargelelektrophorese führte zu Trennungen von racemischen Aminosäuren. (A. Guttman, A. Paulus, A. Cohen, N. Grinberg, B. Karger, J. Chromatogr., 448 (1988) 41).

Eine wesentliche Verbesserung dieser Verfahren zur Enantiomerentrennung kann erreicht werden, wenn der chirale Selektor nicht der mobilen Phase zugesetzt wird, sondern an das Trägermaterial oder an die Glasoberfläche chemisch angebunden und permanent immobilisiert wird.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft demnach ein Verfahren zur selektiven Auftrennung von Enantiomeren durch Trenntechniken, die auf dem Prinzip der Elektromigration in nicht Gel-gefüllten Kapillarsäulen beruhen, mit Hilfe von chiralen, oberflächen-gebundenen und immobilisierten enantioselektiven Stationarphasen, z. B. CHIRASIL-DEX (ein Polysiloxan, an das Cyclodextrin chemisch angebunden ist). Bei diesem Verfahren werden die zu trennenden Enantiomere durch Anlegen eines elektrischen Feldes durch die Trennkapillare bewegt. Die mit dieser Meßanordnung erreichte Effizienz übertrifft bei weitem diejenige bekannter Trenntechniken (z. B. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). Sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der Einzelsubstanzen in achiraler Umgebung gleich, wie beispielsweise bei optischen Isomeren, so wird eine Enantiomerendiskriminierung durch Zugabe eines chiralen, nicht-racemischen Selektors aufgrund der Ausbildung eines schnellen und reversiblen enantioselektiven Verteilungsgleichgewichts erreicht. Bei Verwendung von Cyclodextrinen beruht die Enantiomerendiskriminierung wahrscheinlich auf Inklusion der Analyte in den chiralen Hohlraum des Cyclodextrintorus (vgl. V. Schurig, H.-P. Nowotny, Angew. Chem., 102 (1990) 969).

Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Enantiomerenanalyse erfolgte der Zusatz von nativen oder derivatisierten Cyclodextrinen hauptsächlich durch Zumischen zur Pufferlösung. Trotz der Einfachheit und großen Anwendungsbreite dieser Methode ist diese jedoch mit grundlegenden Nachteilen behaftet, die die routinemäßige Anwendung zur Enantiomerenanalytik erschweren. Eine Rezyklisierung des nach jedem Analysenlauf zu erneuernden Elektrolyten in der Trennkapillare ist oft sehr zeitaufwendig, wobei der zusätzliche Verlust an derivatisiertem Cyclodextrin ( $\gamma$ ) einen nicht unerheblichen Kostenfaktor darstellt. Eine wesentliche Verbesserung der elektrochromatographischen Enantiomerenanalytik stellt erfindungsgemäß die permanente Fixierung nativer und derivatisierter Cyclodextrine an eine im Trennsystem befindliche Oberfläche dar, an der nunmehr erstmals Enantiomerentrennungen durch Elektrochromatographie gelungen sind. Die chiral modifizierte Oberfläche ist im einfachsten Fall die Säuleninnenwand, kann aber auch ein in die Säule gebrachtes Packungsmaterial (z. B. die in der HPLC üblichen Trägermaterialien) darstellen. Die Aufbringung des Cyclodextrins auf die Oberfläche erfolgt bevorzugt durch direkte chemische Anbindung. Erfindungsgemäß muß die Anbindung in nicht-Gel-gefüllten Kapillarsäulen jedoch nicht ausschließlich durch vorherige chemische Bindung an ein unlösliches oder immobilisierbares Polymer erfolgen, denn auch im Puffer unlösliche Cyclodextrinderivate bieten durch Benetzung der Oberfläche die Möglichkeit zur enantioselektiven Wechselwirkung. Die sich aus der erfindungsgemäßen Durchführung der Methode zur Enantiomerenanalytik in der Kapillarelektrophorese ergebende Fülle von Wegen zur Oberflächenfixierung von Cyclodextrinen (oder anderen chiralen Selektoren), führt bevorzugt zum Einsatz von cyclodextrinhaltigen Polymeren auf Polysiloxanbasis wie zum Beispiel CHIRASIL-DEX (oder anderen chiralen Polymeren) (V. Schurig, D. Schmalzing, M. Schiemer, Angew. Chem. 103 (1991) 994). Aufgrund der oft hohen Enantioselektivität verbunden mit den Vorteilen von Polysiloxanen, wie einfaches Belegen von Oberflächen, leichte Immobilisierbarkeit und hohe chemische Stabilität hat sich die chirale Stationarphase CHIRASIL-DEX auch schon in anderen Verfahren (Inklusionsgaschromatographie und Superkritische-Fluid-Chromatographie) bewährt (V. Schurig et al., J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 713 und 14 (1991) 58). Die folgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Verfahren erläutern, ohne dieses jedoch einzuschränken.

## Beispiele

## Beispiel 1

Die Anbindung der Cyclodextrinderivate an das Polysiloxan erfolgt durch Hydrosilylierung (V. Schurig et al., J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 713 und 14 (1991) 58). Vor der Belegung einer Fused Silica Kapillarsäule (z. B. 50  $\mu$ m Innendurchmesser, 1 m Länge) werden ungefähr 3 mm der Polyimidschicht für die On-column-Detektion beispielsweise durch Abbrennen beseitigt. Die Belegung erfolgt nach der statischen Methode. CHIRASIL-DEX (Abb. 1) wird dazu in einem leichtflüchtigen Lösungsmittel (z. B. n-Pentan) gelöst. Die Immobilisierung der chiralen Phase erfolgt bevorzugt thermisch bei 250°C. Durch gaschromatographische Messungen mit einschlägigen racemischen Testsubstanzen werden Immobilisierungsgrad, Selektivität und Effi-

zienz der Säule vorab getestet. Danach wird die Kapillarsäule in ein Elektrophoresegerät (z. B. Kapillar-Elektrophorese-System 100 der Firma GROM, Herrenberg, FRG), ausgestattet mit einer Hochspannungsquelle, einem On-column-UV-Detektor, zwei Puffergefäßen, jeweils eines an der Injektions- und Detektionsseite der Kapillarsäule, eingebaut. Auf vorsichtige Justierung des Detektionsfensters wird geachtet. Die Kapillarsäule wird mit Pufferlösung (z. B. Borat-Phosphat-Puffer pH 7) langsam gespült, danach wird eine Spannung z. B. von 15 kV angelegt. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis bei sehr empfindlicher Einstellung des Detektors und des Integrators (z. B. Shimadzu C-R3A Chromatograph) eine stabile Basislinie zu beobachten ist. Die erreichte Anordnung wird nun zur Enantiomeren-trennung racemischer Analyte eingesetzt (Beispiel 2 und 3). Nach jedem Analysenlauf wird die Kapillarsäule mehrmals mit Puffer und gegebenenfalls mit Wasser oder Methanol gespült. Die Säule zeigte nach zweiwöchigem Dauerbetrieb keine Verminderung ihrer Enantioselektivität (Beispiel 2 und 3) oder eine gravierende Änderung des elektroosmotischen Flusses. Anschließend Messungen in gaschromatographischem Betrieb zeigten für dieselben Testsubstanzen keine Veränderung bezüglich Enantioselektivität und Effizienz.

Dies läßt auf die Stabilität der CHIRASIL-DEX Phase bei elektrochromatographischen Messungen bei einem pH-Wert von 7 schließen.

#### Beispiel 2

An einer nach Beispiel 1 belegten und konditionierten CHIRASIL-DEX-Kapillarsäule gelingt die Enantiomeren-trennung von ( $\pm$ )-1.1'-Binaphthyl-2.2'-diylhydrogenphosphat bei verschiedenen Spannungen (vgl. Abb. 2 (links): Säuleninnendurchmesser 50  $\mu$ m, effektive Säulenlänge bis zum Detektor 80 cm; totale Länge 97 cm, Borat-Phosphat-Puffer pH 7, Detektion: 220 nm, eingesteilte Spannungen 20, 25, 30 kV).

#### Beispiel 3

Unter den Bedingungen der in Beispiel 2 beschriebenen Anordnung erreicht man eine gute Auftrennung der Enantiomeren des 1-Phenylethanol schon bei kleinsten Kapazitätsfaktoren ( $k = 0.13$ ) (vgl. Abb. 2 (rechts): angelegte Spannung 20 kV).

#### Beispiel 4

Für Methanol als Referenzsubstanz und für die in Beispiel 2 gezeigte Trennung zeigt Abb. 3 den Zusammenhang zwischen Retentionszeit und angelegter Spannung an einer unbelegten Kapillarsäule und einer mit immobilisierten CHIRASIL-DEX belegten Kapillarsäule. Die insgesamt erhöhten Retentionszeiten an den mit CHIRASIL-DEX belegten Kapillarsäulen beweisen neben einem erniedrigten elektroosmotischen Fluß, bedingt durch die Maskierung der Silanolgruppen durch die Belegung, das Auftreten eines zusätzlichen chemischen Verteilungsgleichgewichtes im elektrokinetischen System.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von Enantiomeren durch Elektromigration in Kapillarsäulen, dadurch gekennzeichnet, daß chirale Stationärphasen ver-

wendet werden, die als Film aufgebracht und an die im Trennsystem befindlichen Oberflächen fixiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß immobilisiertes CHIRASIL-DEX zur Oberflächenmodifizierung eingesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxylgruppen der Cyclodextrinkomponente in CHIRASIL-DEX frei oder alkylt (unverzweigt, verzweigt bis C<sub>100</sub>) oder acyliert oder perfluoracyliert (unverzweigt, verzweigt bis C<sub>100</sub>) vorliegen und daß  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , oder  $\delta$ -Cyclodextrin eingesetzt wird.

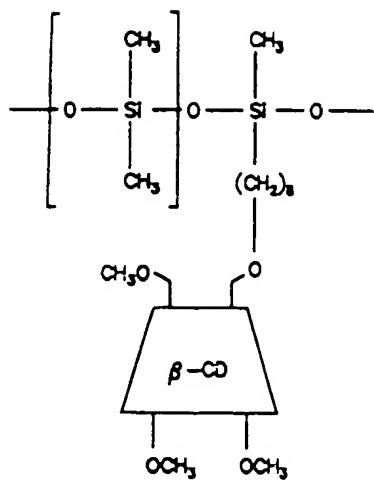
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Anbindung der Cyclodextrinkomponente an das Polysiloxan in CHIRASIL-DEX über eine verzweigte oder unverzweigte Alkylidenkette beliebiger Länge erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polysiloxankomponente in CHIRASIL-DEX, deren organische Reste alle bisher bekannten Radikale (Alkyle, Aryle, funktionalisiert oder unfunktionalisiert) darstellen können, auf Silica-Oberflächen (Glas, Fused Silica, Silicagel) immobilisiert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der chirale Stationärphasenfilm entweder durch Aufbringen von CHIRASIL-DEX geschaffen wird oder durch On-Column-Reaktionen von cyclodextrinhaltigen reaktiven Bausteinen entsteht.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1



CHIRASIL-DEX

Abb. 2

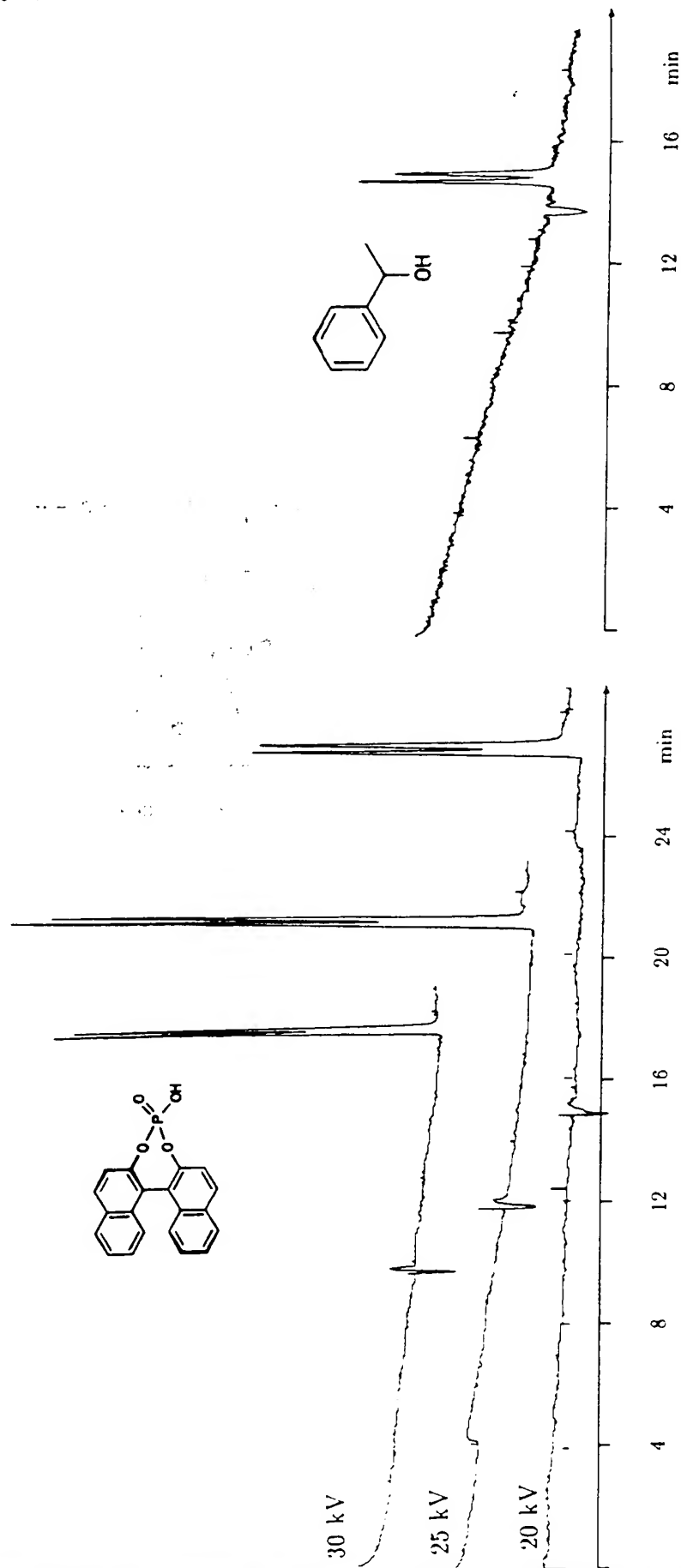


Abb. 3

